

猪源纤维蛋白贴对大鼠肝脏及肝素化兔臀大肌创面的止血作用[△]

李伟达^{1,2*}, 邓乐君^{1,3}, 朱晋辉⁴, 陈灶妹^{1,2}, 李健^{1,2}, 张俊辉⁵, 万华印⁵, 李茹冰^{1,2#}(1.广州军区广州总医院药剂科/广州市老年慢病患者合理用药重点实验室, 广州 510010; 2.广东药科大学中药学院, 广州 510006; 3.南方医科大学药学院, 广州 510515; 4.南方医科大学检验与生物技术学院, 广州 510515; 5.广州市拜特泌医药科技有限公司, 广州 510663)

中图分类号 R332;R605.972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3911-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.07

摘要 目的:研究猪源纤维蛋白贴(DBT)对大鼠肝脏和肝素化兔臀大肌出血创面的止血效果。方法:48只大鼠和24只兔均随机分为假手术组、手术对照组(纱布止血)、医用胶原蛋白海绵组和DBT组,除假手术组外,其他各组动物分别建立大鼠肝脏出血模型或肝素化兔臀大肌静脉出血模型。记录各组动物止血时间、计算出血量;观察大鼠术后3、13周DBT降解、肝脏创面愈合及粘连情况;考察医用胶原蛋白海绵组和DBT组肝素化兔的再渗血率。结果:与假手术组比较,手术对照组动物的止血时间和出血量均显著升高($P<0.01$);与手术对照组比较,DBT组和医用胶原蛋白海绵组动物的止血时间和出血量均显著减少($P<0.01$)。术后3周和13周,各组大鼠创面均有不同程度粘连,但粘连评分比较差异无统计学意义($P>0.05$);术后13周两给药组大鼠肝脏肝缘稍钝,但基本已恢复至术前状态,愈合状况良好;DBT能降解、吸收完全。DBT组兔的再渗血率为33.3%,医用胶原蛋白海绵组为66.7%。结论:DBT对脆性脏器和凝血功能障碍机体具有较好的止血效果,且能降解吸收;其作用效果与医用胶原蛋白海绵相当,且黏合强度略强于后者。

关键词 纤维蛋白贴;肝脏出血;臀大肌出血;止血;凝血功能障碍;大鼠;兔

Study on the Hemostatic Effect of Porcine Fibrin Sealant Patch on Bleeding Wound of Liver in Rats and Gluteus Maximus in Heparinized Rabbits

LI Weida^{1,2}, DENG Lejun^{1,3}, ZHU Jinhui⁴, CHEN Zaomei^{1,2}, LI Jian^{1,2}, ZHANG Junhui⁵, WAN Huayin⁵, LI Rubing^{1,2} (1.Dept. of Pharmacy, General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA/Guangzhou Key Laboratory of Rational Drug Use for the Elderly with Chronic Disease, Guangzhou 510010, China; 2.School of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3.School of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 4.School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 5.Guangzhou Beit Song Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the hemostatic effect of porcine fibrin sealant patch (DBT) on bleeding wound of liver in rats and gluteus maximus in heparinized rabbits. METHODS: 48 rats and 24 rabbits were randomly divided into sham operation group, operation control group (gauze hemostasis), medical collagen sponge group and DBT group. Except for sham operation group, animals in other groups were reduced for rat model with liver bleeding or heparinized rabbit model with gluteus maximus bleeding. The hemostatic time was recorded, bleeding amount was calculated; DBT degradation and wound adhesion in liver after 3, 13 weeks were observed; re-bleeding rate of heparinized rabbits in medical collagen sponge group and DBT group were investigated. RESULTS: Compared with sham operation group, the hemostatic time and bleeding amount of animals in operation control group were significantly increased ($P<0.01$). Compared with operation control group, the hemostatic time and bleeding amount of animals in DBT group and medical collagen sponge group were significantly reduced ($P<0.01$). After 3, 13 weeks, different degree of adhesion appeared in the wound of rats in each group, while the adhesion scores had no statistical significances ($P>0.05$). After 13 weeks, liver margin of rats in administration groups was slightly blunt, but it basically had been restored to preoperative state, with good healing. DBT can be degraded and absorbed completely. The re-bleeding rate of rabbits in DBT group were

△ 基金项目:国家科技重大新药创制项目(No.2013ZX09J13110);中央军委2016年度军队后勤科研计划项目(No.CGZ16C009);广州市科技计划项目(No.201509010012、201704020173)

* 硕士研究生。研究方向:药理学。电话:020-36221191。E-mail:liweida123@126.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:生化药理、新药研究。电话:020-36221191。E-mail:lrb90927@126.com

33.3%, 66.7% in medical collagen sponge group. CONCLUSIONS: DBT has good hemostatic effect on fragile organs and the body with blood coagulation dysfunction, and can be degraded and absorbed. Its effect is equivalent to medical collagen, while the adhesive strength is slightly better than the latter.

KEYWORDS Fibrin sealant patch; Hepatorrhagia; Gluteus maximus bleeding; Hemostasis; Blood coagulation dysfunction; Rats; Rabbits

止血不仅是抢救伤员和外科手术的重要措施,而且是战地救援时的主要手段之一。传统的包扎、结扎、压迫止血和药物促凝等方法对实质性器官的大面积渗血以及肝素化后手术过程的出血难以起到有效止血作用^[1]。近年来,可吸收性止血材料的开发成为了止血领域研究的热点。医用胶原蛋白海绵具有低抗原性和良好的生物相容性,使用后有利于细胞附着和迁移^[2],但黏附性较差、易脱落。纤维蛋白胶为主动性止血物,模拟人体内凝血机制的最后一步——形成不溶性纤维蛋白,达到快速止血的目的。但其使用方法复杂,在出血量大时易被冲掉,难以凝集成胶状。猪源纤维蛋白贴(DBT)是从猪体内提取的有效成分,其将正常情况下会发生反应的纤维蛋白原和凝血酶冻干在一起,并增加冻干胶原蛋白层,形成双层冻干海绵片。DBT在理论上能达到生化止血与机械止血相结合的目的,体现更优越的止血性能。本实验旨在研究DBT对大鼠体内脆性脏器以及凝血功能障碍兔臀大肌静脉出血创面的止血效果,并观察动物术后的创面黏连和药物降解情况,为研发DBT作为可吸收止血制品提供药效学参考。

1 材料

1.1 仪器

ER353A 儿童理发器(日本松下公司);SB32000 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

DBT(广州市众为生物技术有限公司,批号:20140501,规格:5 cm×10 cm×0.5 cm,含纤维蛋白原5 mg/cm²、凝血酶6 U/cm²、胶原蛋白3 mg/cm²,于25℃以下保存);医用胶原蛋白海绵(无锡贝迪生物工程有限公司,批号:20140407,规格:5 cm×5 cm×0.2 cm);戊巴比妥钠(美国Sigma公司,批号:140418,纯度:>90%);10%水合氯醛(广州军区广州总医院自制,批号:140526,规格:9 g);肝素钠注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司,批号:51502109,规格:2 mL:12 500 u)。

1.3 动物

SPF级SD大鼠48只,♀♂各半,体质量220~250 g,6~8周龄,实验动物许可证号:44007200017081(♂)、44007200017082(♀);普通级新西兰兔24只,♀♂各半,体质量2.0~2.4 kg,10~14周龄,实验动物许可证号:44007600002235(♂)、44007600002305(♀)。动物均由广东省医学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 大鼠肝脏创面止血实验

将48只SD大鼠随机分成4组,即假手术组、手术对照组、医用胶原蛋白海绵组和DBT组,每组12只。各组大鼠ip 10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)麻醉后,固定、上腹部去毛,常规消毒,于腹部剑突下正中开一2~3 cm切口,暴露肝脏,用棉签小心将大鼠肝左外叶游离于垫有

纱布块的腹腔外。接着用病理切片刀在肝脏表面切除一层2 cm×2 cm的组织,擦去渗出血液,DBT组和医用胶原蛋白海绵组大鼠立即贴上2.5 cm×2.5 cm DBT(或医用胶原蛋白海绵),并用已称质量的无菌纱布块轻轻按压创口。待创口不再出血,记录止血时间,计算出血量,出血量(g)=止血后纱布块质量-止血前纱布块质量。手术对照组大鼠擦去渗出血液后则直接用无菌纱布块压迫止血。大鼠止血后肝脏复位,分别缝合肌层和表皮。假手术组大鼠开腹游离肝叶后,即复位、关闭腹腔。术后3、13周后各组大鼠分别取6只开腹观察DBT降解、腹腔内粘连和肝脏愈合情况,并对粘连程度进行评分。评定标准参考Nair SK等^[3]报道方法并加以改进:完全无粘连,计0分;肝叶间或肝叶与腹壁间有1条粘连带,计1分;肝叶间或肝叶与腹壁间有2条粘连带,计2分;肝叶间或肝叶与胃肠道间或与腹壁间有较大面积粘连,但能钝性分离,计3分;肝叶直接粘连到腹壁,必须锐性分离,计4分。

2.2 肝素化兔臀大肌创面止血实验

24只新西兰兔按“2.1”项下方法分组,每组6只。各组兔耳缘静脉iv 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg),并iv肝素钠(500 u/kg)。之后,各组兔左侧臀大肌术区剃毛,碘酊、75%乙醇消毒表皮,切开皮肤,找到臀大肌上纵向的粗大静脉,用病理切片刀切除1 cm×2 cm、厚约1 mm的臀大肌肌肉(切除部位包含臀大肌上的静脉)。擦去喷出的血液,DBT组和医用胶原蛋白海绵组兔立即将2.5 cm×5 cm的DBT(或医用胶原蛋白海绵)贴于创面,同时用已称质量的纱布块盖在止血材料上,按压1 min,之后每30 s观察一次止血情况。待创面不再出血时记录止血时间(超过15 min则以15 min计),称量纱布块的质量并计算止血量。手术对照组兔擦去开始流出的血液后用已称质量纱布块吸取流出的血液(不加按压)。假手术组兔在暴露臀大肌静脉后不制造创面,其余处理与手术对照组相同。此外,医用胶原蛋白海绵组和DBT组在止血初步成功后10 min,最大限度屈伸兔左侧髋关节、膝关节10次,记录止血材料是否脱离并计算再渗血率(再出血动物只数/动物总数×100%)。

2.3 统计学处理

采用SPSS 13.0软件对所得数据进行统计分析。止血时间和出血量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性和正态分布时采用单因素方差分析,各组间多重比较采用Dunnett-*t*检验;方差不齐或非正态分布时采用Kruskal-Wallis检验。粘连程度评分采用Wilcoxon秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠肝脏创面止血实验结果

3.1.1 止血时间和出血量 与假手术组比较,手术对照组大鼠的止血时间和出血量均显著增加($P < 0.01$);与

手术对照组比较, DBT组和医用胶原蛋白海绵组大鼠的止血时间均显著缩短($P < 0.01$), 出血量均显著减少($P < 0.01$), 结果详见表1。

表1 各组大鼠肝脏创面的止血时间和出血量比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab 1 Comparison of hemostatic time and bleeding amount in liver wound of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	止血时间,s	出血量,g
假手术组	1.0 ± 0.9	0.00 ± 0.00
手术对照组	607.0 ± 225.2*	1.29 ± 0.59*
医用胶原蛋白海绵组	27.8 ± 6.1#	0.08 ± 0.07#
DBT组	24.1 ± 2.9#	0.15 ± 0.08#

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与手术对照组比较,# $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.01$; vs. operation control group, # $P < 0.01$

3.1.2 愈合情况和粘连程度 术后3周解剖, DBT组和医用胶原蛋白海绵组绝大部分大鼠肝脏创面仍有肉眼可见药物残留;而在术后13周,药物降解吸收完全,无明显残留物,两组大鼠肝脏肝缘稍钝,但已基本恢复至术前状态,愈合状况良好。术后3、13周,各组大鼠均无感染和死亡;与假手术组比较,各组大鼠手术创面均有不同程度的粘连($P < 0.01$);DBT组和医用胶原蛋白海绵组较手术对照组的粘连减轻,但差异均无统计学意义($P > 0.05$),结果详见表2。

表2 各组大鼠肝脏创面止血后粘连程度评分比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 2 Comparison of adhesion degree score after wound hemostasis in liver of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	术后3周得分只数					术后3周粘 连平均分	术后13周得分只数					术后13周 粘连平均分
	0分	1分	2分	3分	4分		0分	1分	2分	3分	4分	
假手术组	6	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
手术对照组	0	0	2	3	1	2.83 ± 0.75*	1	3	2	0	0	1.17 ± 0.75*
医用胶原蛋白海绵组	0	1	2	3	0	2.33 ± 0.82*	0	4	2	0	0	1.33 ± 0.52*
DBT组	0	1	4	1	0	2.00 ± 0.63*	2	2	2	0	0	1.00 ± 0.89*

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.01$

3.2 肝素化兔臀大肌创面止血实验结果

与假手术组比较,手术对照组兔的止血时间和出血量均显著增加($P < 0.01$);与手术对照组比较,DBT组和医用胶原蛋白海绵组兔的止血时间明显缩短($P < 0.01$),出血量显著减少($P < 0.01$);在屈伸兔左侧髋关节、膝关节10次后,医用胶原蛋白海绵组兔的再渗血率为66.7%,DBT组为33.3%,结果详见表3。

4 讨论

早在20世纪90年代,纤维蛋白胶作为止血药(止血材料)已被美国FDA批准上市^[4],凝血酶也已被1995年版《中国药典》(二部)收载。根据原国家食品药品监督管理局规定,自2006年9月30日起,纤维蛋白胶类产品

表3 各组兔臀大肌创面的止血时间、出血量和再渗血率比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 3 Comparison of hemostatic time, bleeding amount and re-bleeding rate in gluteus maximus wound of rabbits in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	止血时间,s	出血量,g	再渗血率,%
假手术组	42.3 ± 32.7	0.1 ± 0.1	
手术对照组	742.2 ± 189.7*	18.1 ± 6.0*	66.7
医用胶原蛋白海绵组	72.3 ± 27.8#	3.0 ± 2.0#	33.3
DBT组	122.3 ± 54.5#	3.6 ± 3.0#	

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与手术对照组比较,# $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.01$; vs. operation control group, # $P < 0.01$

已从医疗器械改为按照药品注册管理。该类止血制品模拟正常生物血液凝固的最后反应阶段,不依赖机体本身的止血机制。在钙离子促进下,凝血酶直接作用于纤维蛋白原,形成纤维蛋白单体,且凝血酶能激活凝血因子VII、XIII,使纤维蛋白单体经过氢键共价结合成为不溶性纤维蛋白丝多聚体^[5]。同时,凝血酶还能增强凝血因子V、XIII活性,具有促进血小板和上皮细胞生成等作用,促使凝血酶原转变为凝血酶^[6-7],加速凝血。

纤维蛋白胶喷涂后能迅速形成一层半透明的网状纤维蛋白凝胶,该凝胶具有一定的机械强度和黏合力,黏附创面而达到防止渗血的作用,并能促进伤口愈合;但该制剂在使用前需较长的溶解过程,且用于止血时易与其他组织粘连,这些缺点限制了其应用^[8]。孟志云等^[9]研制的纤维蛋白胶粉解决了溶解时间过长的的问题,但粉剂易造成使用时混合配比不均匀。近年来,关于复合冻干纤维蛋白敷料的研究相对较多^[10-13],能起到生化止血和机械止血相结合共同增加止血效果的作用。黄远铿等^[14]研究的纤维蛋白贴中,纤维蛋白成分与胶原蛋白相结合,并添加核黄素,起到诱导创面细胞再生的作用。Richard W等^[15]研究了国外的Fibrin patch(FP)在猪部分肾切除手术中的止血效果,结果显示FP在不闭塞肾动脉的情况仍能有效止血。可见,固体纤维蛋白冻干海绵片是未来纤维蛋白类止血产品的发展趋势。

本实验研究的DBT的有效成分均为猪源性,其来源广泛易得,可大大降低成本。而且该猪血浆是利用静脉导管无菌采血法获得(专利申请号:201520170962.1),相对屠杀式采血法,可避免血液污染,并能减少动物的浪费。胶原蛋白则是从健康生猪的肌腱中获得,胶原具有良好的生物降解性、细胞适应性和低抗原性,并能促进细胞增殖^[16]。混有纤维蛋白原与凝血酶的胶原蛋白,能在纤维蛋白胶黏附、封锁创面后继续吸收渗出的血液,阻止血液冲破贴敷料。

本研究表明,DBT和医用胶原蛋白海绵组均能明显降低大鼠的出血量、缩短止血时间,且DBT组相比于

医用胶原蛋白海绵组的平均止血时间较短,但平均出血量较大,推测DBT能迅速贴附、封闭创面而缩短止血时间,但其吸收液体能力则较弱。实验发现,已上市的医用胶原蛋白海绵结构空隙小且多,较DBT致密、韧性好;在肝素化兔臀大肌切割静脉出血的止血实验中也发现,上市对照物的止血时间也略短于DBT。然而,单纯胶原蛋白与创面的黏附性却不如DBT,在最大限度屈伸兔左侧髋关节、膝关节后,DBT组兔的再渗血率明显低于医用胶原蛋白海绵组。可见,加入纤维蛋白原和凝血酶冻干层的DBT在止血持久性方面具有一定优势,用于体内创面不易移位或脱落。另一方面,相比于上市产品,DBT的结构致密性、蛋白的纯度或含量在工艺上还有提升的空间。

从大鼠的粘连程度评分结果看出,术后3周DBT组、医用胶原蛋白海绵组和手术对照组大鼠均有不同程度的粘连;而术后13周,DBT和胶原蛋白海绵材料在大鼠体内基本降解,粘连情况也均有好转。DBT在组织粘连方面较医用胶原蛋白海绵略为轻微,可能与胶原蛋白的黏合不紧密导致二次渗血或移位有关。虽然DBT为异源性蛋白止血制品,但用于大鼠术后观察至13周,并无动物死亡,药物在体内可降解吸收完全,13周后无肉眼可见残留物。可见,DBT并未引起机体剧烈的免疫反应,但具体的过敏性、免疫性及其他相关毒理学仍需进一步研究。

综上所述,DBT对动物体内脆性脏器和凝血功能障碍性机体的出血创面均能有效止血,其与伤口的贴附力和止血持久性相比于单纯的胶原蛋白海绵更具优势。而且DBT的原料来源易得,成品携带方便,使用操作简单,可根据需求不同,裁剪成各种规格,符合临床手术应用和军事战备的实际要求。若在后续的相关药理毒理学研究中,未发现明显的毒性反应,则DBT有望成为新型的纤维蛋白类止血产品。

参考文献

[1] Mabry RL, Holcomb JB, Baker AM, et al. United States Army Rangers in Somalia: an analysis of combat casualties on an urban battlefield[J]. *J Trauma*, 2000, 49(3): 515-529.

[2] 赵士海,胡庆柳,钟志勇,等.胶原/纤维蛋白止血效果观察[J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(5): 61-65.

[3] Nair SK, Bhat IK, Aurora AL. Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhe-

sions[J]. *Arch Surg*, 1974, 108(6): 849-853.

[4] Spotnitz WD. Fibrin sealant: the only approved hemostat, sealant, and adhesive: a laboratory and clinical perspective [J]. *ISRN Surg*, 2014, doi: 10.1155/2014/203943.

[5] Janmey PA, Winer JP, Weisel JW. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications[J]. *J R Soc Interface*, 2009, 6(30): 1-10.

[6] 张松达.浅谈止血药凝血酶的研究进展[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(16): 98-99.

[7] Stalker TJ, Welsh JD, Tomaiuolo M, et al. A systems approach to hemostasis: 3. thrombus consolidation regulates intrathrombus solute transport and local thrombin activity [J]. *Blood*, 2014, 124(11): 1824-1831.

[8] 赵海全,王冬桃.医用生物蛋白胶对犬肝脾实验性损伤的止血效果观察[J]. *中国兽医杂志*, 2003(1): 17-18.

[9] 孟志云,窦桂芳,刘敏霞,等.纤维蛋白胶干粉对大鼠出血模型的止血作用[J]. *军事医学科学院院刊*, 2002, 26(1): 51-53.

[10] 赵雄,曾晓涵,马玉媛,等.纤维蛋白止血敷料的生物相容性研究[J]. *中国输血杂志*, 2010, 23(4): 247-249.

[11] Koea J, Baldwin P, Shen J, et al. Safety and hemostatic effectiveness of the fibrin pad for severe soft-tissue bleeding during abdominal, retroperitoneal, pelvic, and thoracic (non-cardiac) surgery: a randomized, controlled, superiority trial[J]. *World J Surg*, 2015, 39(11): 2663-2669.

[12] Koea JB, Batiller J, Patel B, et al. A phase III, randomized, controlled, superiority trial evaluating the fibrin pad versus standard of care in controlling parenchymal bleeding during elective hepatic surgery[J]. *HPB*, 2013, 15(1): 61-70.

[13] 赵雄,曹晓涵,马玉媛,等.纤维蛋白止血敷料的止血效果[J]. *中国输血杂志*, 2010, 23(4): 250-252.

[14] 黄远铿,肖百全,欧慧瑜,等.新型止血材料纤维蛋白贴的止血作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(8): 1140-1145.

[15] Hutchinson RW, Broughton D, Barbolt TA, et al. Hemostatic effectiveness of fibrin pad after partial nephrectomy in swine[J]. *J Surg Res*, 2011, 167(2): 291-298.

[16] Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability [J]. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78(78): 929-958.

(收稿日期:2016-12-16 修回日期:2017-08-22)

(编辑:刘明伟)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅